

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018646

International filing date: 14 December 2004 (14.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-134583  
Filing date: 28 April 2004 (28.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

15.12.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

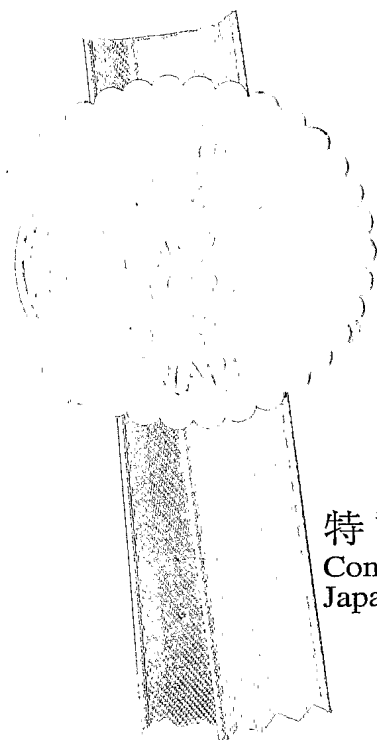
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年   4 月 2 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 1 3 4 5 8 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 1 3 4 5 8 3 ]

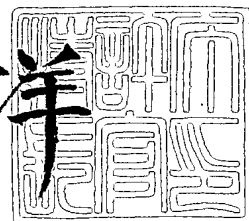
出   願   人            独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構  
Applicant(s):



特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

2 0 0 5 年   1 月 2 8 日

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 Y2003-P583  
【提出日】 平成16年 4月28日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12P 21/02  
C12N 15/09  
A61K 38/17  
G01N 33/53

【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南 1 1 条西 1 丁目 5 - 1 7 - 6 0 2  
【氏名】 野口 昌幸

【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 2 条西 1 丁目 7 - 3 0 3  
【氏名】 岡田 太

【発明者】  
【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 3 5 条西 1 0 丁目 3 - 1 - 2 0 7  
【氏名】 廣村 信

【特許出願人】  
【識別番号】 503360115  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】  
【識別番号】 100107984  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 廣田 雅紀  
【電話番号】 03-5575-6500  
【連絡先】 担当

【先の出願に基づく優先権主張】  
【出願番号】 特願2003-416556  
【出願日】 平成15年12月15日

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 044347  
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0316356

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

配列表の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド。

**【請求項 2】**

配列表の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド。

**【請求項 3】**

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

(a) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド。

**【請求項 4】**

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、又は配列番号 10 に示される塩基配列又はこれらの配列の一部または全部を含み、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA。

**【請求項 5】**

請求項 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA。

**【請求項 6】**

請求項 3 ～ 5 のいずれか記載の A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を、遺伝子発現ベクターに組込んで構築したことを特徴とする組換え発現ベクター。

**【請求項 7】**

請求項 6 記載の組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、発現することを特徴とする A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドを製造する方法。

**【請求項 8】**

配列表の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体。

**【請求項 9】**

抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体。

**【請求項 10】**

抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体。

**【請求項 11】**

請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 12】**

ポリペプチドがヒト T C L 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 10 ～ 24 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 13】**

ポリペプチドがヒト T C L 1 B のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 8 ～ 22 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 14】**

ポリペプチドがヒト M T P 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 5 ～ 19 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 15】**

ポリペプチドがマウス T C L 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 9 ～ 24 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 16】**

ポリペプチドがラット MTP 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 9 ～ 24 の配列であることを特徴とする請求項 11 記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 17】**

A k t 活性の特異的阻害が、ホスホイノシチドの A k t への結合の阻害であることを特徴とする請求項 11 ～ 16 のいずれか記載の A k t 活性の特異的阻害剤。

**【請求項 18】**

請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤。

**【請求項 19】**

抗腫瘍剤が、悪性腫瘍の予防、治療のための薬剤であることを特徴とする請求項 18 記載の抗腫瘍剤。

**【請求項 20】**

悪性腫瘍の治療が、乳がん、肺がん、白血病、又はリンパ系腫瘍の予防、治療であることを特徴とする請求項 19 記載の抗腫瘍剤。

**【請求項 21】**

請求項 3 ～ 5 のいずれか記載の A k t 活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、A k t の活性を特異的に抑制する方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 A k t 活性特異的抑制ポリペプチド

【技術分野】

【0001】

本発明は、セリンスレオニンキナーゼ A k t (Protein Kinase B) の活性を特異的に抑制するポリペプチド、該ペプチドをコードする D N A 及び該ポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤或いは該ポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤等に関する。

【背景技術】

【0002】

A k t キナーゼ (Protein Kinase B: 以下、A k t と表示する。) は 1990 年代の初めに相次いでウイルス v - A k t との相同性を手がかりに見つけられたセリンスレオニンリン酸化酵素である。現在までに 3 つのサブタイプがあることが確認されている。これらの分子は 80 % 程度の相同性があり、当初から癌化との関連性が注目されていた。特に、サイトカインの細胞内シグナル伝達の中で細胞死を抑制する中心的な役割を担っていることがわかり注目されている (Genes & Dev., 13:2905-2927, 1999; Annu. Rev. Biochem., 67:481-507, 1998; Biochem.J., 335: 1-13, 1998)。

【0003】

この A k t は、分子量約 57 k D で、プレクストリン相同ドメイン (pleckstrin homology domain: P H ドメイン) にイノシトールリン酸が選択的に結合し、主に細胞膜への局在を規定する役割を果たす機能を N 末端に持つ。また、C 末端側には、リン酸化キナーゼドメインを持つ。ホスファチディルイノシトール-3-キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase: P 13 K) からのシグナルにより P H ドメインに P I P 3 などが結合し、A k t 分子が細胞膜に移行すること、並びに A k t の三次構造を変化させることがその活性化に関与していると推測されている。

【0004】

A k t の活性化にはスレオニン 308 基 (T h r 308)、セリン 473 基 (S e r 473) の 2 つのアミノ酸のリン酸化が必須であると考えられている。T h r 308 は P D K (phosphoinositide dependent kinase) によりリン酸化されることが知られているが、S e r 473 のリン酸化のプロセスは十分に解明されておらず、I L K (integrin linked kinase) や P D K 2 などのいくつかの不確定な分子がそのリン酸化のプロセスに関与している可能性が推測されているに過ぎない。また、最近 S e r 473 のリン酸化に自己リン酸化が可能性も報告されている。

【0005】

活性化された A k t は細胞死抑制に関与する分子のリン酸化を促進することが知られている。この A k t によりリン酸化されるセリン/スレオニン近傍のアミノ酸配列は R X R X X S / T として知られている (J. Biol. Chem. in press, 2000)。B A D. Caspace 9 . F K H R I (forkhead transcription factor) などの分子はこれらのアミノ酸配列を持ち、A k t の生理的条件下での基質として知られている。不活性型 B A D が A k t によりリン酸化され、リン酸化依存的に 14-3-3 タンパク質と結合し、活性型 B c 1-2 や B c 1-X L などの細胞死抑制作用のあるタンパク質を遊離する。これらの既知の機能並びに未解明の種々のターゲットを介して A k t はアポトーシス抑制制御の中心的な役割を担っていると考えられている (Cell, 96:857-868, 1999)。

【0006】

このようにセリン/スレオニンキナーゼ A k t は、細胞内タンパク質のセリン又はスレオニン残基を特異的にリン酸化する機能を有しており、該リン酸化機能によって多細胞器官へのシグナル伝達を媒介する役割を担っている。そして、該 A k t のリン酸化機能によって細胞内の種々の機構が調節されている。例えば、有糸分裂、細胞増殖、細胞分化、脂質代謝の制御、免疫応答、炎症性応答、グリコーゲンの代謝の制御等、細胞内の種々の機構の調節に関与している。同時に、このことは、癌、肥満症、自己免疫障害、炎症、及び

糖尿病 (II型) のような広範囲な種々の疾患や障害に関与していることを意味する。

#### 【0007】

近年、A k t の活性化が、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、或いは、白血病及びリンパ系腫瘍のような血液系がん等に関与することが報告されている (Annu. Rev. Biochem. 68, 965, 1999)。これらの悪性腫瘍においては A k t の活性が上昇することから、A k t の活性化がこれらの悪性腫瘍の原因となっていると考えられている。最近、これらのセリン/スレオニンキナーゼの活性を、セリン/スレオニンキナーゼの H J ループの誘導体であるショートペプチドを用いて調節し、上記のような疾患や障害の治療を行う試みもなされている (特表 2002-500649 号公報)。

#### 【0008】

一方で、プロトオンコジーンとして T C L 1 が知られている。T C L 1 は、ヒト T 細胞前リンパ球性白血病 (T-P L L) でその活性が上がることで注目され、これまでに 3 つの類似するサブタイプ (T C L 1、M T C P 1、T C L 1 b) があることが知られている (Oncogene, 8:2475-2483, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12530-12534, 1994)。これらの遺伝子座、14q、32、 $\chi$ 28 が T 細胞受容体遺伝子座に転座することによりその発現が活性化され、ヒト白血病 (T-P L L) を起こすことが知られている。しかし、13~16 k D の小さなタンパク質で、これまでに知られている特有な機能構造を持たないことから、その機能は全くわからなかった。

#### 【0009】

生理的条件下でのこれらの分子の発現は、比較的限定されている。T L C 1 発現は、分化早期 (C D 3<sup>+</sup>/C D 4<sup>+</sup>/C D 8<sup>+</sup>) T 細胞、並びに形質細胞分化前までの各種 B 細胞のリンパ系細胞に限られている。また、M T C P 1 の生理的条件下での発現の詳細は不明であるが、最近の遺伝子発現の解析結果から活性化 T 細胞で発現が誘導されていることが確認された。T C L 1 b は、ごく最近クローニングされた分子で、T C L 遺伝子座の極めて近くに存在する。マウスでは 5 種のサブタイプが存在し、ヒトでは 1 種のみが存在すると考えられている。この遺伝子の発現は分化初期の胚芽細胞で非常に高い発現があることが報告されている。

#### 【0010】

T C L 1 の遺伝子はクローニングされ、1324 の塩基配列と 113 の T C L 1 のアミノ酸配列が明らかにされている (米国特許第 5, 985, 598 号明細書)。

#### 【0011】

しかし今まで、T C L 1 の機能については全く分かっていなかった。本発明者らは、A k t 活性化のプロセスを解明する目的で A k t に結合するタンパク質分子を酵母を用いた two-hybrid 法によりヒト B 細胞由来のライブラリーを用いて検索した結果、プロトオンコジーン T C L 1 が A k t と結合することを見い出した。すなわち、T C L 1 が A k t と結合し、多量体を形成し、その多量体の A k t が活性化されることを示し、T C L 1 が A k t の活性化を促す A k t の活性補助因子であることを見い出した (Mol. Cell, 6:395-407, 2000)。更に、本発明者らは、T C L 1 が A k t を介した細胞分裂、細胞死 (アポトーシス) の抑制などを亢進し、白血病やヒトリンパ系の腫瘍の病因となっていることを明らかにし、その後の研究により、細胞内及び細胞外でのリコンビナントタンパクを使った免疫共沈法により、T C L 1 が異種の A k t 分子間での重合形成を促進し、T C L 1 が異種の A k t 分子の間で A k t セリン 472/473 残基のリン酸化を促進することを示し、T C L 1 が A k t を活性化する分子学的な機序を明らかにした (J. Biological Chemistry, 277[5], 3743-3751, 2002)。

#### 【0012】

更に、本発明者らは P C R 法を応用した T C L 1 オンコジーンのアミノ酸ランダムライブラリーを作成し、T C L 1 と A k t の結合並びに T C L 1 の重合形成に必要なアミノ酸部位を同定し、また、T C L 1 のダイマー形成或いは A k t との結合能を欠く変異型 T C L 1 を同定した。そして、この変異型 T C L 1 は A k t を活性化 (in vitro 或いは in vivo と) する能力を欠き、ミトコンドリア外膜の安定化、細胞死抑制、A k t の核内へ

の移行など T C L 1 の各種機能を失うことを確認した (Molecular and Cellular Biology, 22[5], 1513-1525, 2002)。すなわち、本発明者らはこれまで機能の分からなかったプロトオンコジーン T C L 1 が、A k t の活性補助因子であり、その活性化に A k t との結合、T L C 1 同士の重合形成が必須であることを見出した。

【特許文献 1】特表 2 0 0 2 - 5 0 0 6 4 9 号公報。

【特許文献 2】米国特許第 5, 9 8 5, 5 9 8 号明細書。

【非特許文献 1】Genes & Dev., 13:2905-2927, 1999。

【非特許文献 1】Annu. Rev. Biochem., 67:481-507, 1998。

【非特許文献 1】Biochem. J., 335:1-13, 1998。

【非特許文献 1】J. Biol. Chem. in press, 2000。

【非特許文献 1】Cell, 96:857-868, 1999。

【非特許文献 1】Oncogene, 8:2475-2483, 1993。

【非特許文献 1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12530-12534, 1994。

【非特許文献 1】Mol. Cell, 6:395-407, 2000。

【非特許文献 1】J. Biological Chemistry, 277[5], 3743-3751, 2002。

【非特許文献 1】Molecular and Cellular Biology, 22[5], 1513-1525, 2002。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 3】

本発明の課題は、セリンスレオニンキナーゼ A k t (Protein Kinase B) の活性を特異的に抑制するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体、及び該ポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤或いは該ポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 4】

本発明者らは、機能の全く分かっていなかったプロトオンコジーン T C L 1 が、ヒト悪性腫瘍等に関与する A k t に直接結合し、A k t の活性化を促す、すなわち、A k t の活性補助因子であることを明らかにし、更に、白血病やヒトリンパ系の腫瘍等の原因になっていることを明らかにしてきた。また、A k t と結合しない変異型 T C L 1 は A k t を活性化する能力を欠き、ミトコンドリア外膜の安定化、細胞死抑制、A k t の核内への移行など T C L 1 の各種機能を失うことを示してきた。これらの一連の研究から、T C L 1 (ヒト) のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 1 0 ~ 2 4 番目の部位が A k t と結合する部位であり、該アミノ酸残基のポリペプチド配列を用いることにより、A k t の活性化に伴う細胞の増殖等の特異的に抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0 0 1 5】

更に、T C L 1 と同様の機能を有する T C L 1 B 及び M T C P 1 (ヒト) においても同様の機能があることを確認し、T C L 1 B (ヒト) のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 8 ~ 2 2 番目の部位、及び M T C P 1 (ヒト) のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 5 ~ 1 9 番目の部位が、A k t の活性化に伴う細胞の増殖を抑制することを見出し、本発明をなした。更に、本発明においては、マウス T C L 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 9 ~ 2 4 番目の部位、及び、ラット T C L 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 9 ~ 2 4 番目の部位が A k t の活性化に伴う細胞の増殖を抑制することを確認した。本発明のポリペプチドは、ホスホイノシチド (phosphoinositide: ホスファチジルイノシトール) の A k t への結合を競合的に阻害する。

【0 0 1 6】

すなわち、本発明は T C L 1 (ヒト) のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 1 0 ~ 2 4 番目の部位に相当するアミノ酸配列 (配列表の配列番号 1)、T C L 1 B (ヒト) のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 8 ~ 2 2 番目の部位に相当するアミノ酸配列 (配列表の配列番号 3)、M T C P 1 (ヒト) のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 5 ~ 1 9 番目の部位に相当するアミノ酸配列 (配列表の配列番号 5)、T C L 1 (マウス) のアミノ酸配列



におけるアミノ酸残基 9～24 番目の部位（配列表の配列番号 7）、及び、T C L 1（ラット）のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基 9～24 番目の部位（配列表の配列番号 9）からなり A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードする DNA（配列表の配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8 又は配列番号 10）からなる。

【0017】

また、本発明は該ポリペプチドのアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド誘導体、及び、それらの配列をコードする DNA、或いは、該配列の DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を包含する。更に、本発明は、該 DNA を発現ベクターに組込んで、組換え発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞に導入して発現することにより、本発明のポリペプチドを製造する方法を包含する。

【0018】

また、本発明は本発明の A k t 活性を特異的に抑制するポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含し、更には、本発明のポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤、及び、該ポリペプチドを有効成分とする悪性腫瘍等の予防、治療のための抗腫瘍剤としての利用を包含する。また、本発明においては、本発明のポリペプチドをコードする DNA を生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、A k t の活性を特異的に抑制する方法を包含する。

【0019】

すなわち具体的には本発明は、配列表の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド（請求項 1）や、配列表の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド（請求項 2）からなる。

【0020】

また、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

(a) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド（請求項 3）や、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、又は配列番号 10 に示される塩基配列又はこれらの配列の一部または全部を含み、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA（請求項 4）や、請求項 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA（請求項 5）からなる。

【0021】

更に本発明は、請求項 3～5 のいずれか記載の A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を、遺伝子発現ベクターに組込んで構築したことを特徴とする組換え発現ベクター（請求項 6）や、請求項 6 記載の組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、発現することを特徴とする A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチドを製造する方法（請求項 7）や、配列表の配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、又は配列番号 9 のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体（請求項 8）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体（請求項 9）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8 記載の抗体（請求項 10）からなる。

【0022】

また本発明は、請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 1）や、ポリペプチドが T C L 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 1 0 ～ 2 4 の配列であることを特徴とする請求項 1 1 記載の A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 2）や、ポリペプチドが T C L 1 B のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 8 ～ 2 2 の配列であることを特徴とする請求項 1 1 記載の A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 3）や、ポリペプチドが M T P 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 5 ～ 1 9 の配列であることを特徴とする請求項 1 1 記載の A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 4）や、ポリペプチドがマウス T C L 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 9 ～ 2 4 の配列であることを特徴とする請求項 1 1 記載の A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 5）や、ポリペプチドがラット M T P 1 のタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基 9 ～ 2 4 の配列であることを特徴とする請求項 1 1 記載の A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 6）や、A k t 活性の特異的阻害が、ホスホイノシチドの A k t への結合の阻害であることを特徴とする請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか記載の A k t 活性の特異的阻害剤（請求項 1 7）からなる。

#### 【0 0 2 3】

更に本発明は、請求項 1 又は 2 記載のポリペプチドを有効成分とする抗腫瘍剤（請求項 1 8）や、抗腫瘍剤が、悪性腫瘍の予防、治療のための薬剤であることを特徴とする請求項 1 8 記載の抗腫瘍剤（請求項 1 9）や、悪性腫瘍の治療が、乳がん、肺がん、白血病、又はリンパ系腫瘍の予防、治療であることを特徴とする請求項 1 9 記載の抗腫瘍剤（請求項 2 0）や、請求項 3 ～ 5 のいずれか記載の A k t 活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードする DNA を生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、A k t の活性を特異的に抑制する方法（請求項 2 1）からなる。

#### 【発明の効果】

#### 【0 0 2 4】

オンコジーン T C L 1 は、A k t（セリンスレオニンリン酸化酵素；Protein Kinase B）の活性補助因子であり、T C L 1 が A k t に直接結合し、A k t の活性化を促す。本発明において、この T C L 1 のアミノ酸配列の中で、A k t に結合する部位を特定し、該 T C L 1、T C L 1 B、及び M T C P 1 の A k t に結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが A k t の活性を特異的に抑えることを見い出すことにより、本発明のポリペプチドの A k t 活性の特異的阻害剤としての利用を可能とした。これまで A k t の特異的ペプチド阻害剤は知られていないことから、本発明のポリペプチドは、全く新しいタイプの A k t の活性阻害剤としての利用が期待できるものである。

#### 【0 0 2 5】

更に、A k t は細胞死を抑制する中心的な役割を担う細胞内シグナル分子であり、多くの癌細胞では、A k t が活性化され、アポトーシスが障害される。この結果、細胞死が減少し、細胞が異常に増殖し、癌の発症の原因となる。A k t はアポトーシスを制御する中心的な分子として知られており、重要な研究テーマとなっているが、この細胞死抑制機構の中心的分子 A k t を特異的に阻害する薬剤は未だに開発されていない。本発明の A k t 活性の特異的阻害剤は、アポトーシス制御など癌の発症の原因となる機構に関与するものであり、T C L 1 遺伝子の過剰発現や癌抑制遺伝子 P T E N の異常による A K T の活性化が背景となる悪性腫瘍の予防又は治療薬の開発につながるものである。A k t の活性は、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、及び白血病或いはリンパ系腫瘍のような血液系腫瘍等の悪性腫瘍に関与することから、本発明の A k t 活性の特異的阻害剤は、抗腫瘍剤（抗癌剤）として、これらの A k t キナーゼの活性化が原因となる様々なヒト悪性腫瘍の予防、治療に用いることができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0 0 2 6】

本発明は、A k t の活性を特異的に抑制するポリペプチド、すなわちヒト T C L 1 オンコジーンのアミノ酸残基 1 0 ～ 2 4 のアミノ酸配列、ヒト T C L 1 B のアミノ酸残基 8 ～

22のアミノ酸配列、ヒトMTC P1のアミノ酸残基5～19のアミノ酸配列、マウスTCL1のアミノ酸残基9～24のアミノ酸配列、及びラットTCL1のアミノ酸残基9～24のアミノ酸配列からなるポリペプチドからなり、該アミノ酸配列は配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、及び配列番号9に示される。また、本発明は、該ポリペプチドのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつAktの活性を特異的に抑制するポリペプチド誘導体からなる。ヒトTCL1オンコジーンのアミノ酸残基配列10～24のアミノ酸配列、ヒトTCL1Bのアミノ酸残基8～22のアミノ酸配列、及びヒトMTC P1のアミノ酸残基5～19のアミノ酸配列、マウスTCL1のアミノ酸残基9～24のアミノ酸配列、及びラットTCL1のアミノ酸残基9～24のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列は、配列表の配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、及び配列番号10に示される。本発明は、該配列のDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつAktの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを包含する。

#### 【0027】

本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7及び配列番号9のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造を基本にして、周知のポリペプチドの合成法によって合成することができる。また、該ポリペプチドをコードするDNA配列を用いて遺伝子工学操作によって、製造することができる。ヒトTCL1オンコジーン全体の遺伝子のDNA配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、米国特許第5、985、598号明細書に開示されており、また、その遺伝子及びタンパク質の配列は、GenBankのデータベースでアクセッションナンバー、X82240及びCAA57708によってアクセスすることができる。また、TCL1の遺伝子の全長(cDNA及びゲノムDNA)を組込んだベクターは、米国の微生物の寄託機関であるATCC (American Type Culture Collection) に特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づく微生物の寄託として、受託番号75923及び75924でそれぞれ寄託されている。更に、マウスTCL1の遺伝子のDNA配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、NCBIのデータベースでアクセッションナンバーNP\_033363によって、ラットTCL1の遺伝子のDNA配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、アクセッションナンバーXP\_345720によってアクセスすることができる。

#### 【0028】

TCL1B全体の遺伝子のDNA配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は文献(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96(6), 2949-2951, 1999)に示されており、NCBIのデータベースにおいて、アクセッションナンバー: AF\_110465によってアプローチすることができる。また、MTC P1全体の遺伝子のDNA配列及び該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は文献(Oncogene 8(9), 2475-2483, 1993)に示されており、NCBIのデータベースにおいて、アクセッションナンバー: BC\_002600によってアプローチすることができる。

#### 【0029】

本発明のポリペプチドを遺伝子工学操作によって製造するには、上記のようなDNA配列の情報から合成によりDNAを作製するか、或いは、上記のようなTCL1の遺伝子源から本発明のDNAを制限酵素を用いて切り出して取得し、該遺伝子を適宜の発現ベクターに組み込み、該組換えベクターを宿主細胞に導入し、発現することによって取得することができる。本発明において、種々のポリペプチド誘導体は、該ポリペプチドをコードする塩基配列のDNAを作製し、該DNAを用いて、発現ベクターを構築し、該発現ベクターを公知の適宜の宿主に導入して、発現することにより製造することができる。種々のポリペプチド誘導体をコードするDNA配列の変異は、周知の遺伝子工学的遺伝子変異手段によって行うことができる。

#### 【0030】

本発明のポリペプチドを遺伝子工学操作によって製造するには、該ポリペプチドをコードするDNAを公知の発現ベクターに組み込み、組換え発現ベクターを構築し、これを宿主細胞に導入して発現することにより行う。組換え発現ベクターの宿主細胞への導入は適宜公知の方法を用いることができる。例えば、原核生物の宿主としては、大腸菌、枯草菌、シュードモナス属の菌株を挙げることができ、該原核生物を宿主として使用する場合のベクターとしては、pUC19、pBR322又はpBR327のような大腸菌株等のベクターを用いることができ、プロモーターとして、例えばトリプトファン・プロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、マーカー遺伝子として、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を用いることができる。

#### 【0031】

真核微生物の宿主としては、酵母が一般に広く用いられ、発現ベクターとしては、例えばYRp7等を用いることができる。高等動物の培養細胞を宿主とする場合には、COS細胞、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）等を用いることができる。プロモーターとしては、例えばアデノウイルス2主後期プロモーター、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルス、ラウスザルコーマウイルスからのプロモーターを、マーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、メトトレキセート耐性ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子等を用いることができる。その他、BmN4細胞、Sf9細胞、Sf21細胞等の昆虫細胞を宿主として用いることができる。

#### 【0032】

本発明においては、ヒトTCL1のアミノ酸残基10～24のアミノ酸配列からなるポリペプチド等、本発明のポリペプチドを用いることにより、ホスホイノシド（ホスファチジルイノシトール）との結合を阻害する結果、Akt（protein Kinase B）活性、細胞増殖、抗腫瘍効果を得ることができる。このペプチドは、リコンビナント蛋白としての投与、ウイルスベクターを用いた投与方法、哺乳類発現ベクターを用いた投与方法が考えられる。TATペプチド（HIVウイルスの蛋白の一部）との融合法によるペプチドの導入法も利用できる。その他、エレクトロポレーション、薬理的に考えられる細胞内導入法を用いることもできる。ペプチドの安定化を図る意味でのペプチドの修飾、PEG（polyethylene Glycol）、FCR（FC Receptor）、他のペプチドとの融合ペプチドの作製などを用いることができる。

#### 【0033】

本発明は、ヒトTCL1のアミノ酸残基10～24のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号2に示される塩基配列）、ヒトTCL1Bのアミノ酸残基8～22のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号4に示される塩基配列）、ヒトMTCp1のアミノ酸残基5～19のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号6に示される塩基配列）、マウスTCL1のアミノ酸残基9～24のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号8に示される塩基配列）、又は、ラットTCL1のアミノ酸残基9～24のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA配列（配列表の配列番号10に示される塩基配列）とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつAktの活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを包含する。

#### 【0034】

ここで、「塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする」条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要素を組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジエンシーと

同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

#### 【0035】

本発明は本発明のAkt活性を特異的に抑制するポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含する。該抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を挙げることができる。該抗体の作製は、本発明のポリペプチドを抗原として、常法により作製することができる。本発明の抗体は、TCL1、TCL1B、又はMTCPLのAktへの結合部位に特異的に結合することにより、TCL1、TCL1B、又はMTCPLのAktへの結合を特異的に阻害することが考えられる。また、本発明の抗体はTCL1、TCL1B、又はMTCPLポリペプチドとの抗原抗体反応により、組織細胞、血清などにおけるTCL1、TCL1B、又はMTCPL遺伝子に関わる疾患の検出に用いることができる。本発明の抗体を用いた免疫学的測定には、例えばRIA法、ELISA法、蛍光抗体法等公知の免疫学的測定法を用いることができる。

#### 【0036】

本発明においては、本発明のポリペプチドを有効成分として、Akt活性の特異的阻害剤として、及び、該ポリペプチドを有効成分として、悪性腫瘍等の予防、治療のための抗腫瘍剤として用いる。本発明のポリペプチドを有効成分として、Akt活性の特異的阻害剤として、及び、悪性腫瘍等の予防、治療のための抗腫瘍剤として用いるには、該ポリペプチドをそれ単独で、或いは、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することにより製剤化して用いることができる。これらのAkt活性の特異的阻害剤又は悪性腫瘍等の予防若しくは治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

#### 【0037】

本発明のAktの活性を特異的に抑制するポリペプチドを癌などの予防・治療に用いる場合は、タンパク質、ペプチド又は抗体などの巨大分子と非共有結合体を形成し、ポリペプチドの構造を変化させ、ポリペプチドの分子を細胞内にデリバリーすることができるChariot (Active Motif社製) 等の細胞毒性のない試薬を用い、Aktの活性を特異的に抑制するポリペプチドを癌細胞に直接接種することができる。なお、投与量は、疾病の種類、患者の体重、投与形態等により適宜選定することができる。本発明のAkt活性の特異的阻害剤又は抗腫瘍剤の投与の対象としては、Aktの活性化が原因となる各種疾病の予防或いは治療を挙げることができ、特には、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、及び白血病或いはリンパ系腫瘍のような血液系腫瘍等の悪性腫瘍の予防、治療を挙げることができる。

#### 【0038】

本発明においては、本発明のAkt活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを生体細胞に導入し、該ポリペプチドを発現することにより、Aktの活性を特異的に抑制することができる。該Akt活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを生体細胞に導入するための動物細胞用発現ベクターとしては、上記本発明のポリペプチドをコードするDNAが動物細胞用ベクターにインテグレートされているものであればどのようなものでもよく、かかる動物細胞用ベクターとしては、上記本発明のポリペプチドをコードするDNAを宿主細胞内で発現させることができる発現系であれば特に制限されない。例示すれば、染色体、エピソード及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。

## 【0039】

これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。また、本発明の動物細胞用発現ベクターには、リポソームも含まれる。これら動物細胞用ベクターの中でも、アデノウイルスベクターが、安全性や使用の便からして特に好ましい。癌などの予防・治療においては病変部位に直接（インサイチュウ）投与することが好ましく、例えば、アデノウイルス発現ベクターを利用する場合は、癌組織等の病変部位に該ベクターの懸濁液を直接接種することができる。また、本発明のAkt活性を特異的に抑制するポリペプチドをコードするDNAを収納したリポソームを用いる場合も、癌組織等の病変部位に該リポソームの懸濁液を直接接種することができる。

## 【0040】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0041】

[Akt及びTCL1結合配列の同定]

酵母two-hybridスクリーニング及び $\beta$ -Galの半定量法を用いてアミノ酸部分変異TCL1クローンとAktとの相互作用について検討した(MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Mar. 2002, P.1513-1525)。

## 【0042】

[Akt-TCL1の結合部位同定のためのTCL1(ヒト)アミノ酸ランダムミューテーションライブラリースクリーニング]

(材料及び方法)

## 1. TCL1ライブラリー

pGAD424(Clontech社)中のヒト全長TCL1を、5'-CCACCAAACCCAAAAAAGAGATCGAATTTCATG及び5'-ATTTCATAGATCTCTGCAGGTCGACGGATCCTCAからなるプライマーを用いてPCR法で増幅し、ランダムTCL1アミノ酸ライブラリーを作製した。

## 【0043】

## 2. TCL1のアミノ酸変異体の作製

TCL1のアミノ酸置換変異体(D16G、K30M、Q46R、174V、M106V、36-38A、又は36A/38Δ)を下記のプライマーを用いて、PCRによって調製し、天然型と変異型をpGAD424(Clontech社)、pME18SHA(Mol. Cell 6:395-407)、又はpCMV Flag(Kodak社)発現ベクターにサブクローンした。

## 【0044】

用いたプライマーは次のとおり(変異したコドンは、小文字で示した):D16Gに対しては、5'-ATG GCC GAG TGC CCG ACA CTC GGG GAG GCA GTC ACC GAC CAC CCG ggc CGC CTG TGG GCC;K30Mに対しては、5'-GTG TAT TTG GAC GAG atg CAG CAC GCC TGG CTG;Q46Rに対しては、5'-G ATA AAG GAT AGG TTA cgg TTA CGG GTG CTC TTG;174Vに対しては、5'-CCA AGC CTG CTG CCT gtc ATG TGG CAG CTC TAC;M106Vに対しては、5'-ATC ATC GGA TCC TCA GTC ATC TGG CAG CAG CTC GAG AAG cac GTC CTC C;36-38Aに対しては、5'-CAG CAC GCC TGG CTG gcc gcc gcc ATC GAG ATA AAG GAT及び逆相補配列;及び36A/38Δに対しては、5'-GCC TGG CTG gcc TTA ATC GAG ATA及び逆相補配列。TCL1のアミノ酸置換変異体(D16G、K30M、Q46R、174V、M106V、36-38A、又は36A/38Δ)の変異位置を図1に示す。

## 【0045】

## 3. 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

TCL1 及び Akt タンパク質の相互作用を検出するために、酵母ツーハイブリッドタンパク質相互作用検出システムによるスクリーニングを行った。

#### 【0046】

Y190細胞 (Clontech社) を、リチウムアセテート法を用いて、既報 (Mol. Cell 6: 395-407; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11534-11539) に準じて、ヒト Akt2 (Akt2/PAS2-1) 及び TCL1 ランダムライブラリーを酵母に発現した。3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾール (SIGMA社) の存在下に、cDNA ライブラリーからの約  $10^4$  個のクローンをスクリーニングした。

His<sup>+</sup>コロニーをフィルターリフトアッセイ (filter-lift assay) を用いて、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -Gal) 活性を測定した。酵母クローンは  $\beta$ -Gal の強度により、3-h ポジティブ (++)、8-h ポジティブ (+)、及び 24-h ネガティブ (-) クローンのカテゴリーに分類した。ヌクレオチドのシーケンシングのために、それぞれのカテゴリーから 10 クローンを選択した。

#### 【0047】

##### 4. 定量的 $\beta$ -Gal アッセイ

Y190細胞 (Clontech社) を、野生型、D16G、K30M、Q46R、I74V、M106V の TCL1 と共に、Akt2/PAS2-1 を用いて、pGAD424 (Clontech社) ベクターを用いて酵母に発現した。TCL1 変異体は、PCR ベースの部位変異 (PCR-based site-directed mutagenesis) 及び/又は Quikchange キット (Stratagene社) により生成した。液体  $\beta$ -Gal アッセイは、ONPG (0-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; Sigma社) を用いて結合度の定量を行った (Mol. Cell 6:395-407)。示された値は、ウェスタン ブロット分析 (GAL4 活性化ドメイン抗体 [Ab]: Clontech社) によって定量し、各々の酵母のトランスフォーマントの発現によって標準化した。

#### 【0048】

##### [実験及び結果]

Akt-TCL1 の結合に必要なアミノ酸残基を決定するために、PCR-介在-ランダム変異によるランダム TCL1 ライブラリーを作製した。置換された DNA ヌクレオチドは各々 dATP は 1.4%、dTTP は 3.8%、dGTP は 4.0%、及び dCTP は 1.4% の発生率であった。このライブラリーにおけるヌクレオチド置換の総頻度は、2.7% であり、挿入-削除率は 0.09% であった。ライブラリーのサイズは、約  $2.5 \times 10^4$  であった。置換部位は、シーケンスされた 25 サンプルクローンにおいて、全 TCL1 分子の 90% 以上に分散していた。

#### 【0049】

次に、各々のクローンと Akt2 との相互作用を調べるために、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。酵母クローンは、 $\beta$ -Gal リフティングアッセイにおけるブルーカラー反応の強度に基づいて 3つのカテゴリーに分類した。(3h で  $\beta$ -Gal ポジティブ [++]、8h で  $\beta$ -Gal ポジティブ [+], 及びネガティブ [-])。各々のカテゴリーの 10 クローンのヌクレオチド配列を決定した。++クローンは、野生型 TCL1 又は P5、P15、D43、L45、P61、M75、及び D88 部位の変異体を含んでおり、該クローンは  $\beta$ -Gal 活性に影響を与えず、該残基は Akt 相互作用に対して反応しなかった。観察された、Akt と低い相互作用 (8h ポジティブ [+]) を示す 10 クローンのアミノ酸置換体と、TCL1 のアミノ酸配列を並べて示した (図1)。

#### 【0050】

これらのクローンの中で、特定の残基において、明らかに置換体の堆積が見い出された。10 クローンのうちの 9 クローンにおいて、D16、K30、Q46、I74、又は M106 におけるアミノ酸の少なくとも 1つにおいて置換体が見い出された。陰性のクローン (-) は、ヌクレオチドの挿入、大量の削除を伴う挿入、構造シフト、及び/又は大量の変異体を含まなかった。それ故に、それ以上の分析から除外した。本発明者は、低下した Akt 相互作用を示したクローンは、Akt-TCL1 相互作用に必要なアミノ酸残基を含むに違いないとの仮説をたてた。そこで、部位特異的突然変異誘発法を用いて、TC

L1に個々の変異体(D16G、K30M、Q46R、I74V、又はM106V)を作製した。D16G及びI74V変異体は、 $\beta$ -Galリフティングアッセイ(図2)及び、定量的液体 $\beta$ -Galアッセイ(図3)に示されるように、D16G、I74Vにおいて変異体Aktとの結合が劇的に低下する結果となった。

#### 【0051】

(TCL1-誘導Akt活性化に必要な、Akt及びTCL1ホモダイマーによる会合)

in vitro キナーゼアッセイにおいて、野生型TCL1は、Aktキナーゼ活性を増大した。このことは、Akt Ser-473リン酸化の程度と優位に相関した。しかしながら、D16G TCL1は、薬量を増加しても試験において、Aktキナーゼ活性に影響がなかった(図4)。D16G TCL1は、GSK-3 $\alpha$ のリン酸化、Akt Ser-473リン酸化とも変化を与えなかった。D16G TCL1は、Aktキナーゼ活性によって評価した。同様に、Aktに結合するが、ホモダイマーを形成しない36-38A TCL1は(in vitro キナーゼアッセイにおいて、リン酸化GSK-3 $\alpha$ 及びSer-473 Aktでの判定による)Aktキナーゼ活性を高めることができない(図5)。これらのことから、Aktと結合しない変異型TCL1は、Aktの活性化能力(in vitro 及びIn vivoとも)を欠くことを示した。

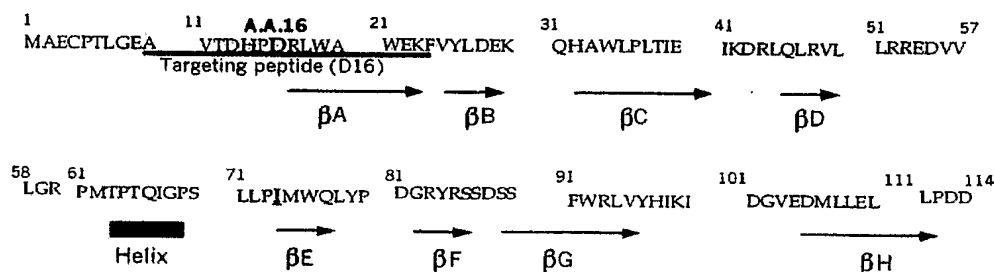
#### 【0052】

(Akt及びTCL1結合配列の作製)

これまでに行われていたTCL1の結晶構造の解析結果から(Molecular and Cellular Biology, Mar. 2002, p. 1513-1525)、D16は第一 $\beta$ シートの最初の部位に存在し、この第一 $\beta$ シートと第4 $\beta$ シートで作られる平面上にAktキナーゼが結合することが考えられた。これらの一連の研究に基づき、TCL1蛋白分子におけるAktとの結合アミノ酸、第16残基(Asparadic Acid)近傍のTCL1オンコジンのアミノ酸残基配列10-24(表1)が、Aktと結合し、Aktの活性化を抑制する阻害剤となりうるのではないかと考えた。

#### 【0053】

【表1】



上記仮定に基づき、このTCL1とAKTの結合部近傍のペプチド、すなわち、TCL1のアミノ酸残基10~24(「10/24」と表示する。)近傍のペプチド並びにコントロールペプチドの二つのペプチドを作製した(表2)。ペプチドは、通常のペプチド合成機で作製してあり、ゲル濾過又はHPLCで精製してある。北海バイオシステム、米国企業で作製されたものを用いた。

#### 【0054】



【表 2】

## 標的ペプチドデザイン

NH<sub>2</sub>-TAT (YGRKKRRQRRR)- Flag(DYKDDDDK)- Target Peptides -COOH  
 10/24 peptide NH<sub>2</sub>-YGRKKRRQRRR- DYKDDDDK- AVTDHPDRLWAWKEF -COOH  
 Control Peptide NH<sub>2</sub>-YGRKKRRQRRR- DYKDDDDK- SQAVHAAHEI -COOH

## 【実施例 2】

## 【0055】

[TCL1 の 10/24 ペプチドのアッセイ]

## 1. MTT アッセイを用いた細胞増殖試験

MTT アッセイを用いた細胞の増殖試験を行った。すなわち、WST-8 試薬 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono sodium salt] (347-07621, Dojin, Kumamoto, Japan) アッセイを用いた細胞の増殖実験において、この TCL1 オンコジーンのアミノ酸残基配列 10/24 ペプチド (NH<sub>2</sub>-AVTDHPDRLWAWKEF -COOH) が AKT 活性化に伴う細胞の増殖を特異的に抑制することを確認した (図 6)。

## 【0056】

この方法では、T4 細胞株を用いた無刺激下での細胞増殖試験で 10/24 ペプチドを 0-50  $\mu$ M の濃度で前処置し、48 時間後に WST-8 試薬アッセイ法を用いてその増殖能を測定し、450 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーを用いた ELISA 法により (Model 550; BioRad, Tokyo, Japan) 測定した。

## 【0057】

## 2. 免疫共沈法による結合試験

10/24 ペプチドの特異的な細胞増殖抑制の原因を検討するために、免疫共沈法を用いて、10/24 ペプチドが Akt キナーゼと特異的に結合することを確認した (図 7)。この方法では、AKT キナーゼをヒト 293 細胞に過剰発現し、採取した細胞溶液を 10/24 ペプチド (NH<sub>2</sub>-AVTDHPDRLWAWKEF -COOH) と約 2 時間インキュベーションする。更に、この処置を行った細胞溶液に、Akt に融合したエピトープに対する特異抗体の結合したアガロースビーズを加え、2-3 時間共インキュベーション (co-incubation) した。その後、この抗体の結合したアガロースビーズを用いて付着する細胞溶液中の分子を免疫沈降し、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により、Akt キナーゼとの結合を検討した。

## 【0058】

## 2. 脂質-タンパク プルダウンアッセイ

TCL1 の 10/24 ペプチドについて、リン脂質-タンパク プルダウンアッセイ (Lipid-protein pull down assay) を行った。

方法: 脂質-タンパク プルダウンアッセイは PIP Beads (PI (3,4,5) P3 Echelon Bioscience Incorporated) を使って行った。10/24 NH<sub>2</sub>-AVTDHPDRLWAWKEF -COOH またはコントロールとして  $\beta$ C NH<sub>2</sub>-EKQHWLPLTIE-COOH) を用いた。50 ng の AKT kinase (unactivated, Upstate Biotechnology, #14-279) を用いて 2 時間 4  $^{\circ}$ C で処置後に 25  $\mu$ l の PIP Beads (PI (3,4,5) P3 Echelon Bioscience Incorporated) を加えて (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.25% NP-40, 140 mM NaCl) を含む溶液で洗浄後、Akt 抗体 (Cell Signaling) を使ってウエスタンブロットを行った (図 8)。図左側の 3 つのレーンでは、1-400  $\mu$ M で AKT との結合を Dose-Dependent に抑制しており、図右側のコントロールペプチドでは全く抑制していない。これらの結果から、このペプチド (NH<sub>2</sub>-AVTDHPDRLWAWKEF -COOH) は Akt キナーゼに対するホスホイノ

シチド (Phosphoinositide: (PI (3,4,5) P3) の結合を競合的に抑制することが確認された。したがって、これが Akt 活性化抑制の機序と考えられた。

#### 【実施例 3】

##### 【0059】

[免疫共沈法による 10/24 ペプチドと Akt サブタイプ分子との結合試験]

免疫共沈法を用いて、10/24 ペプチドと Akt サブタイプ、Akt 1、Akt 2、Akt 3 分子との結合試験を行った。

方法: Akt キナーゼを 293 細胞 (ATCC) に過剰発現した細胞溶液、すなわち、pCMV6 中の Akt 1、Akt 2、又は Akt 3 を、293 細胞 (ATCC) にカルシウムフوسفレート法により発現させ、過剰発現した細胞を採取し、溶解し、そして、プロテイン G/A アガロース混合物 (50% v/v, Pro G/A, Pharmacia) で前処理した。Akt、又はコントロールペプチド ( $\beta$ C) を 400  $\mu$ M で細胞溶解液に添加し、4℃で 3 時間、Pro G/A でインキュベートし、抗 Flag M2 抗体 (Sigma) を添加した。得られた免疫沈降物を洗浄後、ウエスタンブロット法 (anti-HA antibody, 3F10, Boehringer Mannheim) により、Akt キナーゼとの結合を確認した。結果を、図 7 に示す。図に示されるように、10/24 ペプチドは、Akt の 3 種類のサブタイプ分子、Akt 1、Akt 2、及び Akt 3 のいずれとも結合した。

#### 【実施例 4】

##### 【0060】

[GSK を基質として用いた Akt キナーゼアッセイによる Akt 活性化抑制効果試験]

Akt は、GSK (Glycogen Synthesis Kinase 3) のリン酸化を促進することがわかっている。この GSK を基質として用いて、Akt キナーゼアッセイを行い、10/24 ペプチドによる Akt の活性化抑制試験を行った。

方法: インビトロ Akt キナーゼアッセイは (Cell Signaling 社製、#9840、) のキットを用いて行った。哺乳細胞から抽出したリコンビナント Akt 蛋白を 200  $\mu$ M の濃度のペプチドと混合し 2 時間反応させた。リン酸化反応は 4 分間、30 度で行った。反応は SDS ゲルで解析の後、ウエスタンブロット法により GSK のリン酸化を定量した。結果を、図 8 に示す。図 8 に示されるように、10/24 ペプチドは、Akt の GSK ペプチドに対するリン酸化能を効果的に抑制 (図の左側の 3 つのレーンで黒いバンドが薄くなっているのが GSK のリン酸化を抑制していることを示している) した。同様な Akt キナーゼ活性抑制効果は 10-24 (AVTDHPDLWAWKEF) のうちの 11-23 の繰り返し配列を持つペプチド (NH<sub>2</sub>-VTDHPDLWAWEK-RRR-VTDHPDLWAWEK-COOH) を用いても認められた。

#### 【実施例 5】

##### 【0061】

[マウス線維芽細胞腫瘍細胞 (QrSP-11) における Akt リン酸化の活性化抑制効果試験]

マウス線維芽細胞腫瘍 QrSP-11 細胞における 10/24 ペプチドとコントロールペプチドの AKT のリン酸化 (セリン 473 残基、スレオニン 308 残基) の活性化抑制効果について検討した。

方法: QrSP-11 細胞を 50 mM の濃度のペプチドと 16 時間混合する。その後 PDGF (PDGF-AB, Sigma, 3226) で刺激する。細胞を脱リン酸化酵素阻害剤の存在下で溶解し、SDS ゲルで解析、各種抗体 (Cell Signaling; anti-Akt #9272, anti-pThr308 #9275L, and anti-pSer473 #9271L) を用いて ECL (Amersham) によりウエスタンブロットを行う。結果を、図 9 に示す。図に示されるように、10/24 ペプチド処理した細胞では図の右端に示されるように、セリン 473 とスレオニン 308 のリン酸化が共に抑制されている。すなわち、図の左から 2 列目及び 4 列目のような黒いバンドが右端のものでは薄くなっているのが 10/24 ペプチドによってリン酸化の抑制が起こっていることを示している。

## 【実施例 6】

## 【0062】

[10/24 ペプチドの A k t の細胞膜移行及び活性化抑制効果試験]

293細胞 (ATCC) を用い、10/24 ペプチドの A k t の細胞膜移行及び活性化抑制効果について試験した。

方法: 293細胞 (ATCC) に1mgのAKTをFuGENE 6 (Roche Diagnostics) を用いて過剰発現する。16時間後血清を除去し、細胞をPDGF-AB (Sigma社製, #3226) を用いて10分間刺激する。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、FITC-conjugated anti-HA抗体(12CA5, MBL)又はphospho-Ser 473抗体 (587-F11, Cell Signaling) を用いて染色し、Nikon社製共焦点顕微鏡を用いて観察する。

## 【0063】

結果を、図10に示す。図に示されるように10/24処理をした細胞 (g-i) では、コントロールペプチド (a-f) と比べてA k t の細胞膜移行や活性化が抑制されているのが確認された (d又はfに示されるように細胞の周囲が緑又は黄色に光るのであるが、10/24ペプチドでは、jやiに示されるように、この効果が抑制されている: 参考図面)。すなわち、実験の結果から、10/24ペプチドは、細胞内におけるAKTの細胞膜への移行と同時に活性化を抑制することを確認した。本来AKTは細胞の表面に移り活性化されるのであるが、10/24ペプチドで処理した細胞では、このAKTの膜への移行、活性化が抑制されることを確認した。

## 【実施例 7】

## 【0064】

[10/24 ペプチドによるアポトーシスの誘導と抗腫瘍効果]

ヒトT白血病細胞株 (T4: human T cell leukemia cells) を用いて10/24ペプチドの細胞死に対する効果を検討した。

方法: T4細胞株を用いた無刺激下で10/24ペプチド (10/24 peptide NH<sub>2</sub>—AVTDHPDLWWEKF—COOH) を0-30  $\mu$ Mの濃度で前処置し、48時間後にPropidium Iodideで染色し、FACS (Beckton Dickinson社製) により細胞死 (アポトーシス) を判定した。また、この抗腫瘍効果のAKT依存性を確かめるため、myr-AKT (恒常的に活性化されたAKT) を過剰発現した。

結果を、図11に示す。図に示されるように、10/24ペプチドはコントロールペプチドと比べて、細胞死 (アポトーシス) を増強することが判明した。同様な細胞死の増強傾向は、Dexamethasoneによる細胞死の誘導下でも確認された。myr-AKTを過剰発現した結果、細胞死は抑制され (図11、 $\Delta$ )、10/24ペプチドがAKT依存的に効果を発揮していることが、確認された。

## 【実施例 8】

## 【0065】

[10/24 ペプチドによる in vivo 抗腫瘍効果]

移植腫瘍細胞を用いて、10/24ペプチドの in vivo における抗腫瘍効果を検討した。

方法: マウスの線維芽細胞株QrSP-11細胞をC57BL/6マウスの腹壁に移植し、ペプチドによる腫瘍増殖抑制効果を検討した。腫瘍細胞に直接10/24ペプチド或いはコントロールペプチドを注入し (1匹について2  $\mu$ Mづつ週に3回投与した、図に矢印で示す。) 腫瘍径を測定し、その体積を計算した。結果を、図12に示す。図に示されるように、10/24ペプチドでは腫瘍増殖を効果的に抑制することが確認された。

## 【実施例 9】

## 【0066】

[10/24 ペプチド処理によるマウス腫瘍の組織学的な検討]

実施例8の実験的マウス腫瘍を9日目に採取し、肉眼所見、ヘマトキシリン-エオシン (Hematoxylin-Eosin: H&E) 染色 (細胞の核などの状態を観察する方法)、TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labeling, #MK500, Takara) 免疫染色 (アポトーシスというがん細

胞の特殊な死に方を組織学的に同定する方法)、phospho Akt (Ser473)モノクローナル抗体(587F11, Cell Signaling、AKTキナーゼのリン酸化を判定し、活性化を見る方法)により組織学的に検討した。結果を、図13に示す。

#### 【0067】

図の写真に示されるように、肉眼的所見においては、10/24ペプチド処理ではコントロールと比較して明らかに腫瘍が縮小しているのが観察され、H&E染色においては、10/24ペプチド処理では、細胞死が増加しているのが観察され、TUNEL染色においては、10/24ペプチド処理では、アポトーシスの細胞が増加しているのが観察され、また、Akt活性化においては、10/24ペプチド処理ではAktの活性化が抑制されているのが観察された。すなわち、10/24ペプチド処理によるマウス腫瘍の組織学的な検討により、10/24ペプチドは腫瘍の増殖を抑え、アポトーシスを増加させ(H&E, TUNEL)、また、AKT活性を阻害すること(p473染色)が確認された。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0068】

【図1】本発明の実施例の試験において、構築し、観察された、Aktと低い相互作用(8hポジティブ[+])を示す10クローンのアミノ酸置換体について、TCL1のアミノ酸配列と並べて示した図である。

【図2】本発明の実施例の試験において、部位特異的突然変異誘発を用いて導入したTCL1の変異体(D16G、K30M、Q46R、I74V、又はM106V)と野生型TCL1を用いて、 $\beta$ -Galリフティングアッセイを行った結果を示す図である。

【図3】本発明の実施例の試験において、部位特異的突然変異誘発を用いて導入したTCL1の変異体(D16G、K30M、Q46R、I74V、又はM106V)と野生型TCL1を用いて、定量的液体 $\beta$ -Galアッセイを行った結果を示す図である。

【図4】本発明の実施例の試験において、TCL1-誘導Akt活性化に必要な、Akt及びTCL1ホモダイマーによる会合を調べるために、野生型TCL1について、*in vitro* キナーゼアッセイを行った結果を示す図である。

【図5】本発明の実施例の試験において、TCL1-誘導Akt活性化に必要な、Akt及びTCL1ホモダイマーによる会合を調べるために、変異TCL1(36-38A TCL1)について、*in vitro*キナーゼアッセイを行った結果を示す図である。

【図6】本発明の実施例の試験において、AKT活性化に伴う細胞の増殖を特異的に抑制することを確認するために、TLC1オンコジーンのアミノ酸残基配列10/24ペプチドを用いてMTTアッセイを行った結果を示す図である。

【図7】本発明の実施例の試験において、免疫共沈法を用いて、10/24ペプチドとAktサブタイプ、Akt1、Akt2、Akt3分子との結合試験を行った結果のウェスタンブロットの写真である。

【図8】本発明の実施例の試験において、GSK (Glycogen Synthesis Kinase 3)を基質として用いて、Aktキナーゼアッセイを行い、10/24ペプチドによるAktの活性化抑制試験を行った結果のウェスタンブロットの写真である。

【図9】本発明の実施例の試験において、マウス線維芽細胞腫瘍QrSP-11細胞における10/24ペプチドとコントロールペプチドのAKTのリン酸化(セリン473残基、スレオニン308残基)の活性化抑制効果について、各種抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果の写真である。

【図10】本発明の実施例の試験において、293細胞(ATCC)を用い、10/24ペプチドのAktの細胞膜移行及び活性化抑制効果について試験した結果の顕微鏡を用いて観察した写真である。

【図11】本発明の実施例の試験において、ヒトT白血病細胞株(T4: human T cell leukemia cells)を用いて10/24ペプチドの細胞死に対する効果を検討した

結果を示す図である。

【図 1 2】本発明の実施例の試験において、移植腫瘍細胞を用いて、1 0 / 2 4 ペプチドの *i n v i v o* における抗腫瘍効果を検討した結果を示す図である。

【図 1 3】本発明の実施例の試験において、移植腫瘍細胞を用いて、1 0 / 2 4 ペプチドの *i n v i v o* における抗腫瘍効果を検討した実験的マウス腫瘍を 9 日目に採取し、肉眼所見、肉眼的所見における観察、H & E 染色における観察、T U N E L 染色における観察、A k t 活性化における観察の結果を示す写真である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Agency

&lt;120&gt; Polypeptide Specifically Inhibits Akt Activity

&lt;130&gt; Y2003-P583

&lt;140&gt; JP2003-416556

&lt;141&gt; 2003-12-15

&lt;150&gt; JP2003-416556

&lt;151&gt; 2003-12-05

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Ala	Val	Thr	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Leu	Trp	Ala	Trp	Glu	Lys	Phe
1				5				10						15

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

gcagtcaccg accacccgga ccgcctgtgg gcctgggaga agttc

45

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Met	Ala	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Gly	Val	Pro	Pro	Gly	Arg	Leu
1				5				10						15	

Trp Ile Gln Arg Pro Gly Ile Thr Glu Asp Glu Glu Glu Arg  
 20 25 30

<210> 4  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 atggcctccg aagcttctgt gcgtctaggg gtgccccctg gccgtctgtg gatccagagg 60  
 cctggcatct acgaagatga ggaggggaga 90

<210> 5  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Gly Glu Asp Val Gly Ala Pro Pro Asp His Leu Thr Val His  
 1 5 10 15

Gln Glu Gly Ile Tyr Arg Asp Glu Tyr  
 20 25

<210> 6  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 atggcaggag aggatgtggg ggctccaccc gatcacctct gggttcacca agagggtatc 60  
 taccgcgacg aatac 75

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> mouse

<400> 7

Ala Glu Thr Pro Ala His Pro Asn Arg Leu Trp Ile Trp Glu Lys His  
 1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

<400> 8  
 gcagagacac ctgcacaccc caaccgcctg tggatctggg agaagcac 48

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> rat

<400> 9

Pro Glu Thr Pro Pro His Pro Asp Arg Leu Trp Leu Trp Glu Lys His  
 1 5 10 15

<210> 10  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> mouse

<400> 10  
 ccagagacac cccacacccc cgaccgcctg tggctctggg agaagcac 48

<210> 11  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 ccaccaaacc caaaaaaaga gatcgaattc atg 33

<210> 12  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 attcatagat ctctgcaggt cgacggatcc tca 33

<210> 13



<211> 60  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
atggccgagt gcccgacact cggggaggca gtcaccgacc acccgggccc cctgtgggcc 60

<210> 14  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
gtgtatttgg acgagatgca gcacgcctgg ctg 33

<210> 15  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
gataaaggat aggttacggt tacgggtgct cttg 34

<210> 16  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens


<400> 16  
ccaagcctgc tgcctgtcat gtggcagctc tac 33

<210> 17  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
atcatcggat cctcagtcac ctggcagcag ctcgagaagc acgtcctcc 49

<210> 18  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 18



cagcacgcct ggctggccgc ggccatcgag ataaaggat

39

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

gcctggctgg ccttaatcga gata

24

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

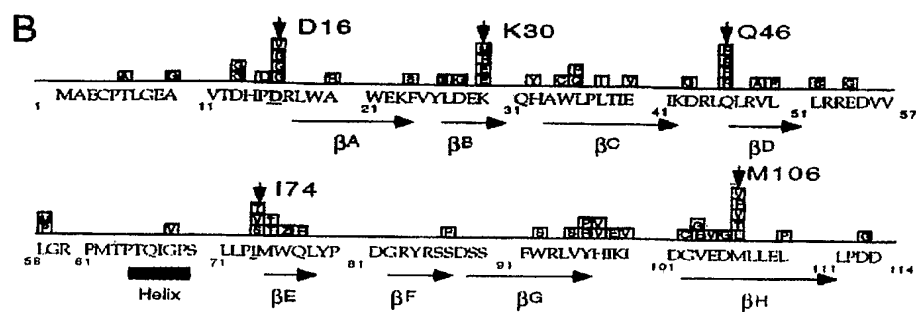
&lt;400&gt; 20

Val	Thr	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Leu	Trp	Ala	Trp	Glu	Lys	Arg	Arg	Arg
1				5					10					15	

Val	Thr	Asp	His	Pro	Asp	Arg	Leu	Trp	Ala	Thr	Glu	Lys
			20					25				

【書類名】図面

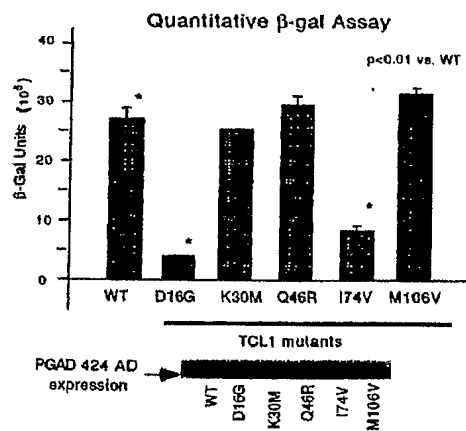
【図 1】



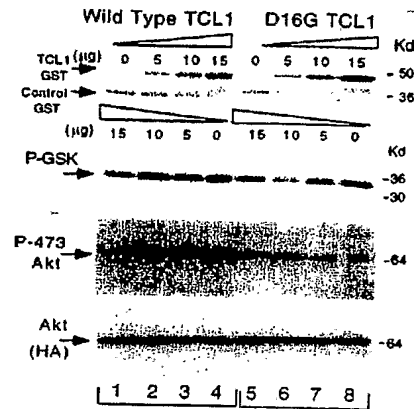
【図 2】

		Clone 1	Clone 2	Clone 3
TCL1	D16G			
TCL1	K30M	●	●	●
TCL1	Q46R	●	●	●
TCL1	I74V	●	●	●
TCL1	M106V	●	●	●
TCL1	Wild Type	●	●	●

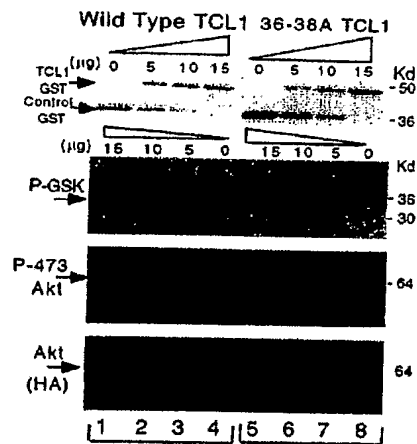
【図 3】



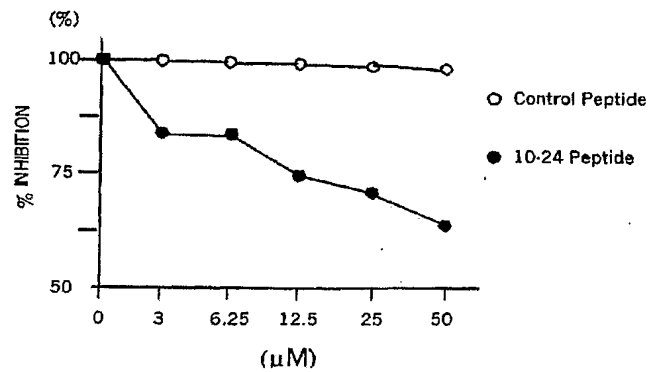
【図 4】



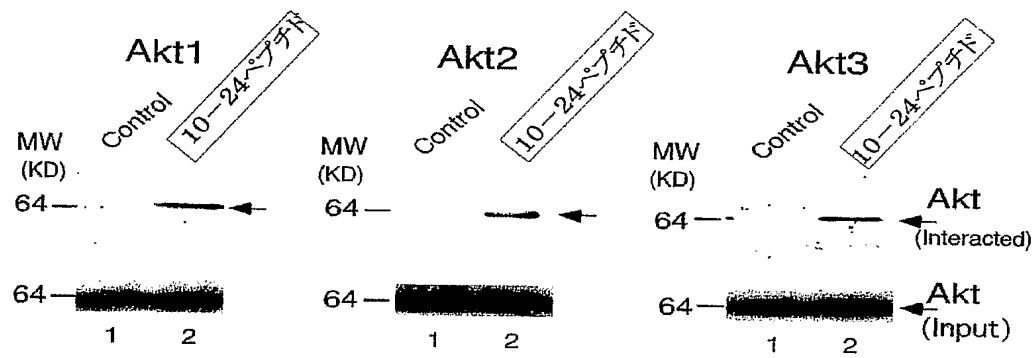
【図 5】



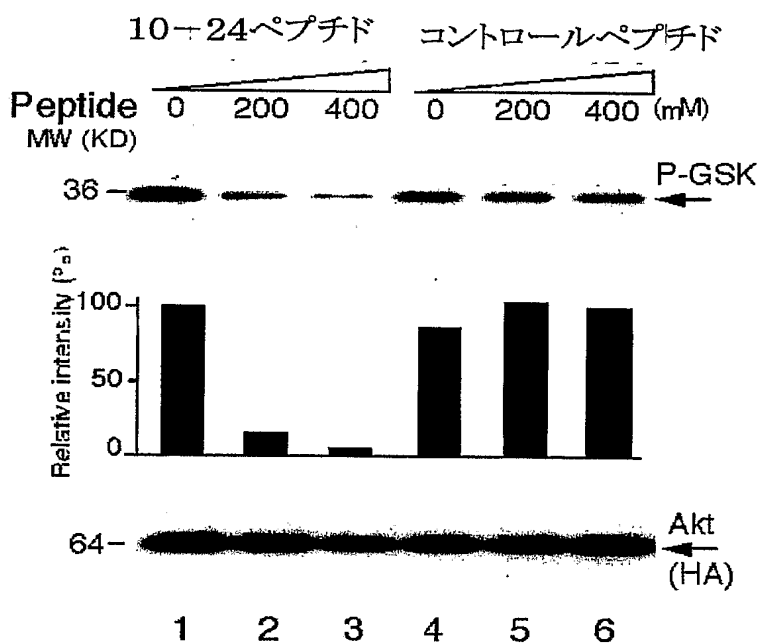
【図 6】



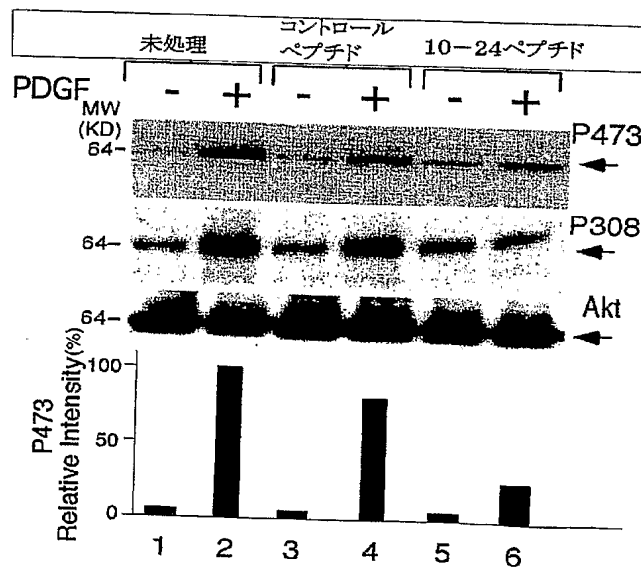
【図 7】



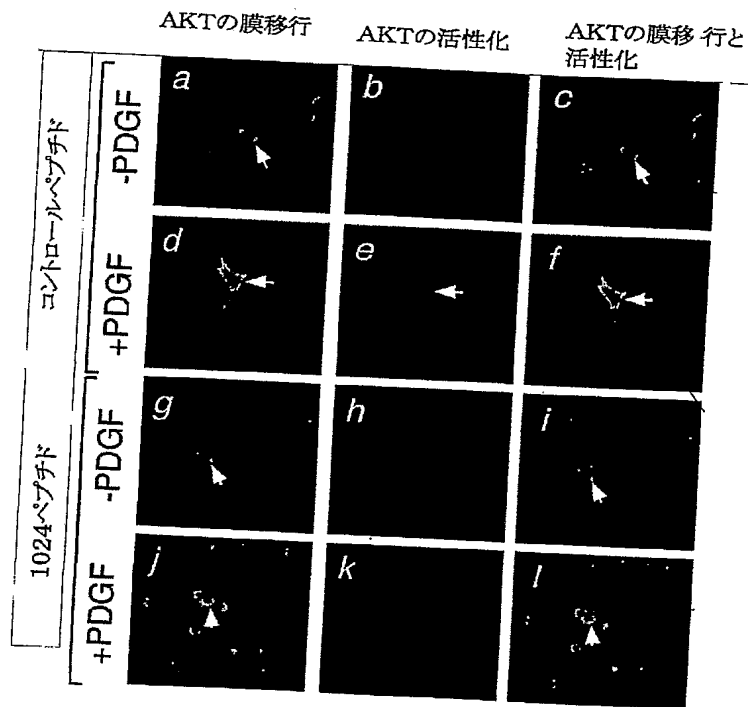
【図 8】



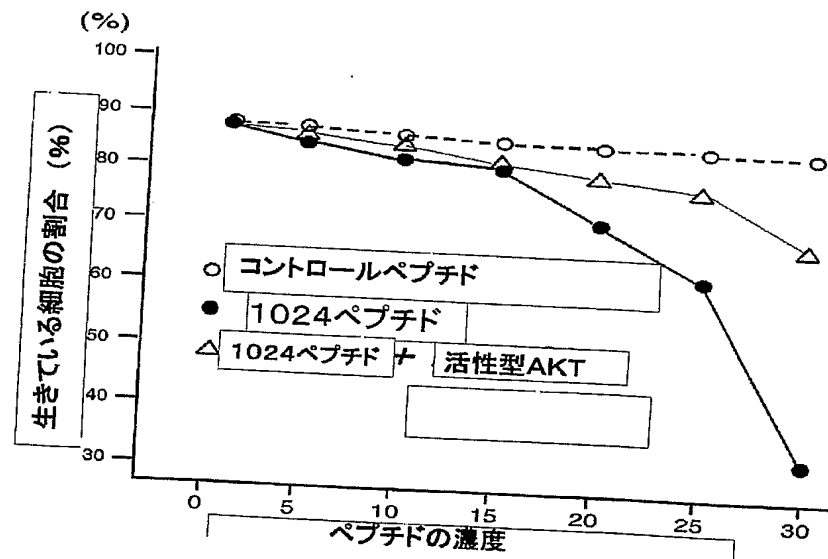
【図 9】



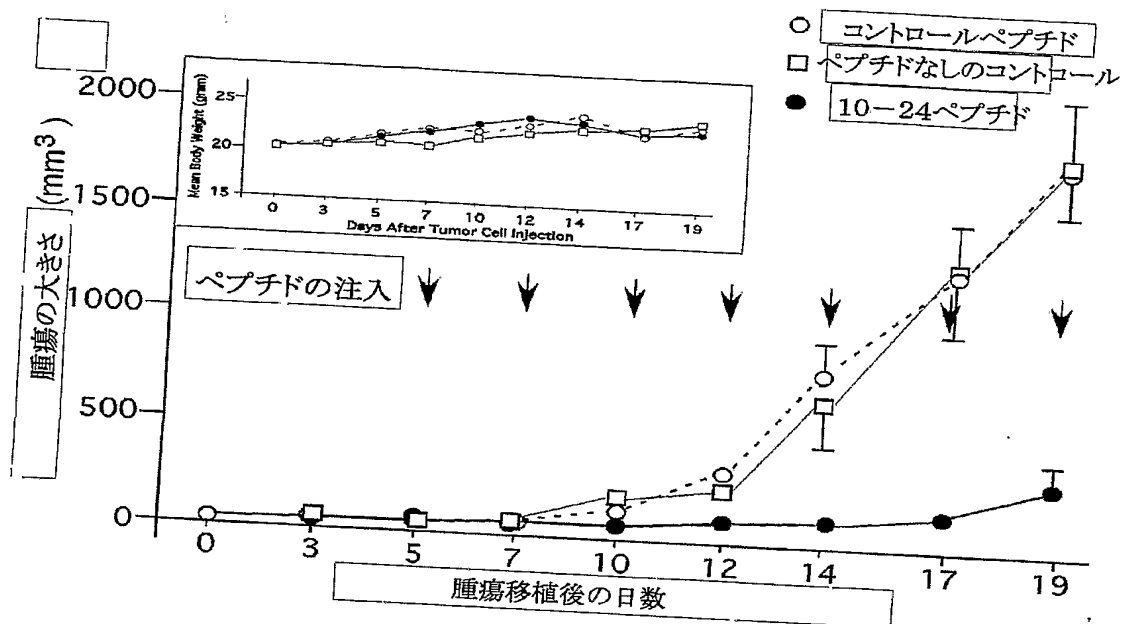
【図 10】



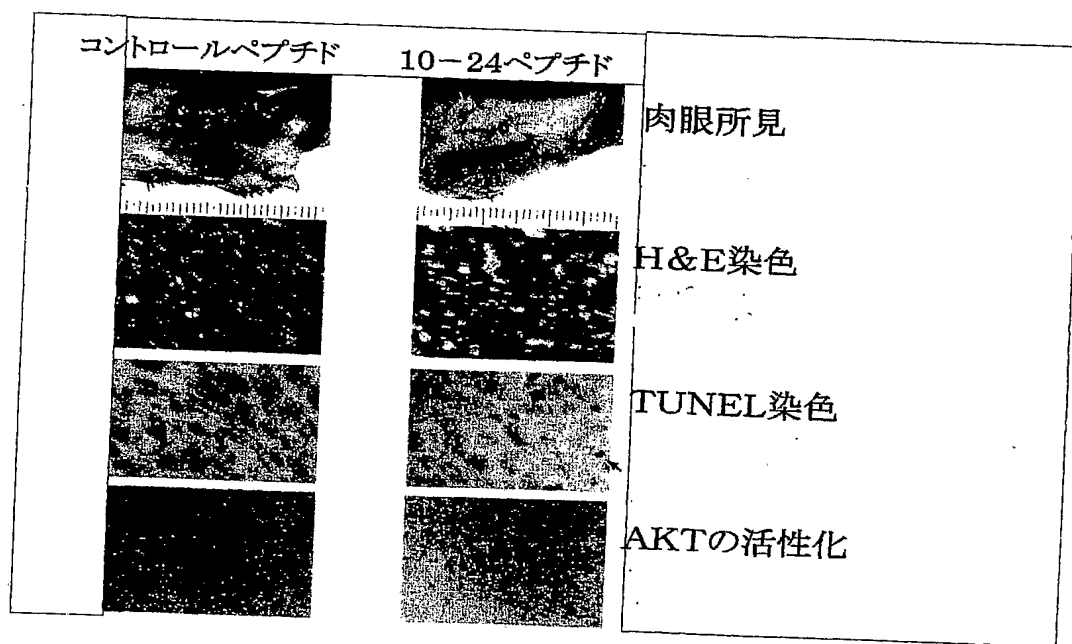
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 A k t (Protein Kinase B) の活性を特異的に抑制するポリペプチド、その DNA、その抗体、及び A k t 活性の阻害剤或いは抗腫瘍剤等を提供すること。

【解決手段】 該ポリペプチドは、ヒト T C L 1 のアミノ酸配列のアミノ酸残基 1 0 ~ 2 4 番目の部位、ヒト T C L 1 B のアミノ酸残基 8 ~ 2 2 番目の部位、ヒト M T C P 1 のアミノ酸残基 5 ~ 1 9 番目の部位に相当するアミノ酸配列、マウス又はラット T C L 1 のアミノ酸残基 9 ~ 2 4 番目の部位に相当するアミノ酸配列からなるポリペプチド（配列表の配列番号 1、3、5、7、及び 9）、及びその誘導体からなる。更に、本発明は、該ポリペプチドをコードする DNA（配列表の配列番号 2、4、6、8、及び 1 0）、及び該ポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含する。本発明のポリペプチドは、A k t 活性の阻害剤或いは抗腫瘍剤等として用いることができる。



特願 2 0 0 4 - 1 3 4 5 8 3

ページ： 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

2 0 0 4 年 4 月 1 日  
名称変更  
埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
独立行政法人科学技術振興機構